

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

48 / 860698

PCT/JP99/07198

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

22.12.99

REC'D 18 FEB 2000

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年12月24日

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第366719号

出 願 人
Applicant(s):

武田薬品工業株式会社

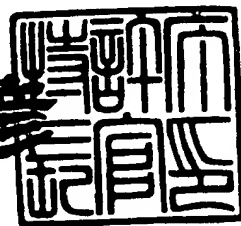
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 2月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-300261

特平 10-366719

【書類名】 特許願
【整理番号】 A98234
【提出日】 平成10年12月24日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/11
【発明の名称】 UCP-2 プロモーターおよびその用途
【請求項の数】 10
【発明者】
【住所又は居所】 兵庫県尼崎市南武庫之荘8丁目29番10号 エスト武庫之荘504号室
【氏名】 豊田 幸生

【発明者】
【住所又は居所】 兵庫県神戸市春日台七丁目5番10号
【氏名】 小林 真

【発明者】
【住所又は居所】 大阪府池田市五月丘1丁目8番3号
【氏名】 井垣 茂

【特許出願人】
【識別番号】 000002934
【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社
【代表者】 武田 國男

【代理人】
【識別番号】 100073955
【弁理士】
【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】
【識別番号】 100110456
【弁理士】
【氏名又は名称】 内山 務

出証特 2000-30

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9000053

【包括委任状番号】 9721047

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 UCP-2プロモーターおよびその用途

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アンカップリングプロテイン-2(UCP-2)のレギュレーター配列を含むプロモーター領域を含有するDNA。

【請求項2】 レギュレーター配列がPPRE(Proxisome Proliferator Response Element)を含有する配列である請求項1記載のDNA。

【請求項3】 レギュレーター配列がC/EBP(CCAAT/Enhancer Binding Protein)結合配列を含有する配列である請求項1記載のDNA。

【請求項4】 プロモーター領域が配列番号：1の第1番目ないし第2270番目で表される塩基配列またはその一部を含有する塩基配列で表される請求項1記載のDNA。

【請求項5】 UCP-2のレギュレーター配列を含むプロモーター領域の発現制御下に構造遺伝子を有するDNAを含有する組換えベクターである請求項1記載のDNA。

【請求項6】 請求項1記載のDNAで形質転換された形質転換体。

【請求項7】 請求項6記載の形質転換体を用いることを特徴とするUCP-2プロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項8】 請求項6記載の形質転換体を用いることを特徴とする抗肥満薬、抗糖尿病薬、降圧薬、抗高脂血症薬または解熱薬のスクリーニング方法。

【請求項9】 請求項6記載の形質転換体を用いることを特徴とするUCP-2プロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項10】 請求項7記載のスクリーニング方法または請求項9記載のスクリーニング用キットを用いて得られるUCP-2プロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は遺伝子発現用新規プロモーターおよびその用途に関する。具体的には、ヒトアンカップリングプロテイン-2(UCP-2)遺伝子のプロモーター領域を含有するDNA、当該DNAで形質転換された形質転換体、UCP-2プロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法などに関する。

【0002】

【従来技術】

アンカップリングプロテイン(UCP)は、ミトコンドリア内膜に存在するプロトントランスポーターである。細胞内に脂肪として貯蔵されたエネルギーを他のエネルギー消費過程を経ずに熱化できることから、恒温動物の体温維持において重要な働きをしていると考えられている。また、このような機能を有していることから恒温動物のエネルギー代謝効率を決定する重要な因子の一つであると考えられている。

アンカップリングプロテインには、現在のところ三種の分子が同定され、各々アンカップリングプロテイン-1(UCP-1)、アンカップリングプロテイン-2(UCP-2或いは、UCPHとも称される)、アンカップリングプロテイン-3(UCP-3)と呼ばれている。

アンカップリングプロテインファミリーの中で最初に単離されたUCP-1は、褐色脂肪細胞に特異的に発現している(Line, C. S.とKlingenberg, M. (1980) FEBS Lett. 113, 299-303, Jacobsson, A.ら (1985) J. Biol. Chem. 260, 16250-16254, Bouillaud, F.ら (1986) J. Biol. Chem., 261, 1487-1490)。UCP-2は、UCP-1のホモログとして単離され、様々な臓器で広く発現していることが確認された(Gimeno, R. E.ら (1997) Diabetes vol. 46, 900-906, Fleury, C.ら (1997) Nature Genet. vol. 15, 269-272)。また、筋肉に特異的に発現するUCPとしてUCP-3は単離された(Vidal-Puig, A.ら (1997) Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 235, No. 1 79-82, Boss, O.ら (1997) FEBS Lett. 408 33-38)。

一般的にUCP-1は、齧歯類や冬眠をする動物の体温維持に重要な役割を果たしていると考えられている。その根拠として身体のサイズが大きい動物および、比較的温暖な気候に生息している動物種は、UCP-1を主に発現する褐色脂肪細胞の数は少ないことがあげられる (Rothwell, N. J.とStock, M. J. (1979) *Nature* vol.1.281,31-35)。このことからヒトを含むこれらの動物では、UCP-1ではなく、UCP-2または、UCP-3が、通常の体温維持機構やエネルギー消費過程の制御を中心的に担っていると考えられている(細田公則ら (1998) *肥満研究* vol.4 No.3 31-35, Sven Enerbackら (1997) *Nature* vol.387,90-93)。

従って、ヒトを含むこれらの動物では、UCP-2あるいは、UCP-3の遺伝子発現あるいは、活性を調節する事によりエネルギー消費/蓄積のバランスを調整する事が可能であると考えられる(細田公則ら (1998) *肥満研究* vol.4 No.3 31-35, Enerback, S.ら (1997) *Nature* vol.387,90-93)。ヒトにおいては、エネルギー消費を亢進することは、食物から摂取したエネルギーの消費促進のみならず、脂肪として蓄積されたエネルギーの消費の促進を促すと考えられている。従って、ヒトにおける体脂肪の減少は、近年先進諸国で問題となっている生活習慣病の主要因である肥満状態の改善につながると考えられている(Fleury, C.ら (1997) *Nature Genetics* vol.15, 269-272)。

さらにUCP-2は、感染等の免疫炎症の際に観られる発熱の主要因であるとも考えられており、UCP-2の遺伝子活性を抑制することにより免疫炎症時の発熱を軽減させることが可能と考えられている(Shigenaga, F. R.ら (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 244, No. 1, 75-78)。

また、動物、特に高等動物では、その発生時より各器官の分化、成熟がおこり生体の各種機能を発揮せしめるようになる。この過程で種々の器官特異的なタンパク質の一過性の、あるいは恒常的な発現が起こり、器官に特異性を付与することとなる。

一般的な動物での遺伝子発現の制御機構としては、転写誘導系(プロモーター・エンハンサー)が存在する。プロモーター領域は、染色体遺伝子上の通常メッセンジャーRNAへと転写が行われる塩基配列の5'上流域に隣接して存在し、このプロモーター領域の一般にレギュレーター配列と称される塩基配列に転写制御因子

としての蛋白質が結合もしくは、結合している蛋白質が乖離することにより3' 下流域にある遺伝子の転写量を調節している。従って、転写段階での遺伝子発現量は、プロモーターの活性を測定することによりある程度、推定できる。また、プロモーターの活性は、多くの場合3' 下流域の塩基配列に影響されないことも知られていることから、転写するメッセンジャーRNAを検出可能な酵素活性等を有する蛋白質(以下、レポーターと称する)をコードする塩基配列に置換する事により簡便に測定することが可能である。このレポーターを用いたプロモーターの活性測定は、近年の技術革新により非常に高感度かつ簡便なものとなっており、薬物のスクリーニングや、生体機能の解析に利用されている。

例えば、脂肪細胞分化の転写制御因子としてPPARg(Peroxisome Proliferation-activated Receptor g) (Tontontz, P.ら (1995) Curr. Opin. Genet. Dev. Vol.5, 571-576)、RXR(Retinoid X Receptor)、C/EBP(CCAAT/enhancer binding protein)(Cornelius, P.ら (1994) Annu. Rev. Nutr. Vol.14,99-129)などがあげられる。脂肪細胞に関連する遺伝子の発現にはこれらの転写制御が深く関わっている事がわかっている。UCP-2を含む脂肪細胞関連遺伝子のプロモーター領域にはこれらの転写制御因子の結合配列(レギュレーター配列)があることが報告されている。プロモーター内のこれらの配列は実際の生体内におけるUCP-2の転写制御に重要な役割を果たしていると考えられる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

従って、UCP-2あるいは、UCP-3の遺伝子および蛋白の発現を亢進させる物質は、体脂肪含量を低下させる抗肥満薬となりうる。またUCP-2は、感染等の免疫炎症の際に覬られる発熱の主要因であるとも考えられており、UCP-2の遺伝子活性を抑制する物質は免疫炎症時の発熱を軽減させる得る。

上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、UCP-2の合成を促進もしくは抑制する作用を持つ薬剤のスクリーニング法として使用できる。抗肥満薬となりうる物質をスクリーニングする場合、プロモーター-レポーター系にこれらのレギュレーター配列が含まれることでより生体内により近い反応性を得ることができ、ヒトの抗肥満薬のス

クリーニングにおいて、非常に有利である。

しかし、現在まで、レギュレーター配列を含むヒトUCP-2プロモーターは同定されておらず上述のようなプロモーターを用いたヒトUCP-2遺伝子発現作用物質を簡便にスクリーニング可能な方法は存在しなかった。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、UCP-2遺伝子発現作用物質を探索するスクリーニング方法の確立を目指して、ヒトUCP-2 cDNA断片をプローブとしてヒトUCP-2ゲノム遺伝子を取得することに成功した。この遺伝子を制限酵素消化してUCP-2をコードしている構造遺伝子の一部を含むその上流部分6.5kb DNAを取得した。このうち、第1exon、第2exonと推定される塩基配列を含む3.5kb DNA (5'上流域としては2.5kb DNA)を再びプラスミドDNA上にクローニングした

この3.5kb DNAの下流に、リポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を連結したプラスミドDNAを構築し、該DNAで形質転換されたHepG2細胞の形質転換体でのルシフェラーゼ活性を測定することにより、UCP-2構造遺伝子上流部分3.3kb DNAに、UCP-2プロモーターを見出すことが出来た。さらに詳細な解析の結果、UCP-2の発現を制御していると思われるレギュレーター配列を見いだした

本発明者らは、これらの知見に基づきさらに研究した結果、本発明を完成した。

【0005】

すなわち本発明は、

- (1) アンカップリングプロテイン-2(UCP-2)のレギュレーター配列を含むプロモーター領域を含有するDNA、
- (2) レギュレーター配列がPPRE(Proxisome Proliferator Response Element)を含有する配列である上記(1)記載のDNA、
- (3) レギュレーター配列がC/EBP(CCAAT/Enhancer Binding Protein)結合配列を含有する配列である上記(1)記載のDNA、
- (4) プロモーター領域が配列番号：1の第1番目ないし第2270番目で表さ

れる塩基配列またはその一部を含有する塩基配列で表される上記（１）記載の DNA、

（５）UCP-2のレギュレーター配列を含むプロモーター領域の発現制御下に構造遺伝子を有するDNAを含有する組換えベクターである上記（１）記載の DNA、

（６）上記（１）記載のDNAで形質転換された形質転換体、

（７）上記（６）記載の形質転換体を用いることを特徴とするUCP-2プロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（８）上記（６）記載の形質転換体を用いることを特徴とする抗肥満薬、抗糖尿病薬、降圧薬、抗高脂血症薬または解熱薬のスクリーニング方法、

（９）上記（６）記載の形質転換体を用いることを特徴とするUCP-2プロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

（１０）上記（７）記載のスクリーニング方法または上記（９）記載のスクリーニング用キットを用いて得られるUCP-2プロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬組成物などに関する。

【0006】

【発明の実施の形態】

本発明のUCP-2のレギュレーター配列を含むプロモーター領域を含有するDNAは後述のレギュレーター配列を含み、UCP-2のプロモーター活性を有するDNAであればいかなるものであってもよい。

具体的には、配列番号：１の第１番目ないし第2270番目で表される塩基配列またはその一部を含有するものであればいかなるものであってもよい。

また、①ゲノムDNA、②ヒトの細胞（例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる

組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、唾液腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、軟骨、関節、骨格筋などに由来の cDNA、合成 DNA のいずれでもよい。

本発明のヒト UCP-2 のプロモーター領域を含有する組換え DNA は、具体的には、次のようにして得ることができる。

まず、既に報告されているヒト UCP-2 cDNA (Fleury, C. ら (1997) Nature Genet. Vol. 15, 269-272) のアミノ酸配列に対応する塩基配列をプローブとして例えば、EMBL3 ベクターに組み込まれたヒト遺伝子ライブラリーを公知の方法でスクリーニングし、このプローブと反応する 1 ファージのクローンを得る。このファージクローンより DNA を抽出し、組みこまれているヒト遺伝子部分の制限酵素地図を作成し、cDNA の最上流域プローブと反応する制限酵素消化による DNA 断片を、特に限定されないが、pCD ベクター、cDM8 ベクター (Aruffo, A. と Seed, B. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 8573-8577)、レトロウイルスベクター (Cone, R. D. と Mulligan, R. C. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6349-6353) など動物細胞用のもの、pUC ベクター (Vieira, J. と Messing, J. (1987) Methods in Enzymology 153, 3-11)、pCR-blunt ベクター (Ausubel, F. M. ら (1994), Current Protocols in Molecular Biology) など大腸菌用のプラスミドなどに再クローニングする。クローニングした DNA の塩基配列を決定し、例えば cDNA の塩基配列と比較検討することにより遺伝子上の翻訳開始コドンの位置を知ることができる。また、既知の cDNA の 5' 末端と塩基配列を比較することにより該遺伝子の転写開始点を知ることにもできる。また、全シーケンスのモチーフ検索を行うことで、既知の転写制御因子の結合部位を知ることができる。

得られた DNA は目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。

さらにプロモータの活性を調べるためにはプロモータの下流に検出可能な構造遺伝子を連結すればよい。プロモーター領域の下流に連結される構造遺伝子とし

ては、種々のレポーター遺伝子を用いられる。レポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ、CAT(クロラムフェニコールアセチル転移酵素(Chloramphenicol acetyl transferase)遺伝子、アルカリフォスファターゼ遺伝子の他に、b-ガラクトシダーゼ遺伝子が汎用されているが、他のいかなる構造遺伝子であっても、その遺伝子産物の検出法があれば使用され得る。上記構造遺伝子をベクターに組み込むには、プロモーター領域の下流に存在する適当な制限酵素切断部位に、上記構造遺伝子が正しく転写される方向に連結すればよい。

【0007】

上記組換えベクターにより形質転換する宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクレック・アシズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由

来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO(dhfr⁻)細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエロマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞, 白色脂肪細胞、卵細胞、ES細胞 (Evans, M. J.とKaufman, K. H. (1981) Nature, 292, 154) などが用いられる。

なかでも、動物細胞、特に白色脂肪細胞が用いられ得る。また動物個体へのDNA移入への一過程としての卵細胞、あるいはES細胞 (Evans, M. J.とKaufman, K. H. (1981) Nature, 292, 154) も使用される。

これらの細胞への形質転換の方法としては、リン酸カルシウム法 (Grahamら (1973) Virology 52, 456)、エレクトロポレーション法 (石崎ら (1986) 細胞工学, 5, 577)、マイクロインジェクション法などが用いられる。

より具体的には、エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メッソズ・イン・エンザイモロジー (Meth

ods in Enzymology), 194 巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 75 巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコル, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52 巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行なうことができる。

上記形質転換体は、特定の化合物の存在下に培養し、培養物中の遺伝子産物の量を測定し比較することにより、該化合物のプロモーター活性のコントロール能を知ることができる。

【0008】

該形質転換体の培養はそれ自体公知の方法で行なう。宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地の pH は約 5～8 が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含む M9 培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるため

に、例えば、 3β -インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約 $15\sim 43^{\circ}\text{C}$ で約 $3\sim 24$ 時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約 $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ で約 $6\sim 24$ 時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77 巻, 4505 (1980)] や 0.5% カザミノ酸を含有する SD 培地 [Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81 巻, 5330 (1984)]] が挙げられる。培地の pH は約 $5\sim 8$ に調整するのが好ましい。培養は通常約 $20^{\circ}\text{C}\sim 35^{\circ}\text{C}$ で約 $24\sim 72$ 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した 10% ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地の pH は約 $6.2\sim 6.4$ に調整するのが好ましい。培養は通常約 27°C で約 $3\sim 5$ 日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約 $5\sim 20\%$ の胎児牛血清を含む MEM 培地 [サイエンス (Science), 122 巻, 501 (1952)], DMEM 培地 [ヴィロロジー (Virology), 8 巻, 396 (1959)], RPMI 1640 培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199 巻, 519 (1967)], 199 培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73 巻, 1 (1950)] などが用いられる。pH は約 $6\sim 8$ であるのが好ましい。培養は通常約 $30^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$

で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0009】

レギュレーター配列として具体的には、配列番号：1中の第1番目ないし第2270番目で表される塩基配列中、UCP-2の転写制御因子が結合し得る配列であれば、いかなるものであってもよいが、例えば、配列番号：1中の第284番目ないし第296番目で表されるPPRE(Proxisome Proliferator Response Element)を含有する配列、配列番号：1中の第1316番目ないし第1320番目、第1364番目ないし第1368番目または第1698番目ないし第1692番目で表されるC/EBP(CCAAT/Enhancer Binding Protein)結合配列を含有する配列、配列番号：1中の第753番目ないし第758番目、第1023番目ないし第1030番目、第1450番目ないし第1455番目で表されるGRE(Glucocorticoid Response Element)を含有する配列、配列番号：1中の第1428番目ないし第1437番目で表されるMyoDを含有する配列などがあげられる。

即ち、本発明のDNAは該レギュレーター配列を含むプロモーター領域を含有するDNAであり、本発明のDNAは該レギュレーター配列を複数個含有していてもよい。

配列番号：1の第1番目ないし第2270番目で表される塩基配列の一部を含有する塩基配列としては、上記のレギュレーター配列を含有する塩基配列であれば、いかなるものでもよいが、具体的には、配列番号：1の第255番目ないし第430番目で表される塩基配列、配列番号：1の第255番目ないし第717番目で表される塩基配列、配列番号：1の第717番目ないし第1133番目で表される塩基配列、配列番号：1の第1133番目ないし第1389番目で表される塩基配列、配列番号：1の第255番目ないし第1857番目で表される塩基配列などがあげられる。

【0010】

本発明のDNAは、UCP-2のレギュレーター配列を含むプロモーター領域を含有するDNAであるため、上記の形質転換体を用いることによって、UCP-2プロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングすることが可能となる。以下に該スクリーニング方法、スクリーニング用キットおよびこれらスクリーニング方法、スクリーニング用キットを用いて得られ

るUCP-2プロモーター活性を促進または阻害する化合物について具体的に説明する。

(1) UCP-2プロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする方法

上述の本発明のDNAで形質転換された形質転換体は、本発明のUCP-2プロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩を探索し、または決定するために有用である。

本発明のUCP-2プロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩の決定方法においては、本発明の形質転換体を試験化合物と接触させた場合と本発明のUCP-2プロモーター領域を含有しない形質転換体を試験化合物と接触させた場合のポリペプチドの発現量を測定し比較することなどを特徴とする。

該試験化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

発現されるポリペプチドとしては、上記の構造遺伝子（好ましくはレポーター遺伝子）がコードするポリペプチドなどが用いられる。

ポリペプチドの発現量の測定方法としては、例えば、Brasier, A.R.ら (1989) Biotechniques vol.7, 1116-1122の記載に準じた方法により、ルシフェラーゼ活性を測定することなどがあげられる。

【0011】

(2) UCP-2プロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングするために用いるスクリーニング用キット

本発明のUCP-2プロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩の決定用キットは、上述の形質転換体を用いることを特徴とするが、本発明のUCP-2プロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩の決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

①スクリーニング試薬

1.細胞培養用培地

Dulbecco's modified Eagle's MEM(ギブコ社製)にウシ胎仔血清(ギブコ社製)を10%添加したもの。

2.細胞分化用培地

Dulbecco's modified Eagle's MEM(ギブコ社製)にウサギ血清(ギブコ社製)を5%添加したもの。

3.UCP-2プロモーター活性測定用プラスミド

本発明のUCP-2プロモーター配列およびUCP-2プロモーターの下流に構造遺伝子(例、ルシフェラーゼ遺伝子)を挿入したpGL3-basic(プロメガ社製)プラスミドDNA

4.宿主細胞株

MG-63細胞株(骨髓腫細胞株:ATCCより入手)

5.試験化合物

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に細胞分化培養用培地にて1 μ Mに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

②スクリーニング法

宿主細胞株を96穴マイクロプレートに 5×10^4 /穴ずつ播種し、一晚37℃、5% CO₂ 孵卵器で培養する。

本発明のUCP-2プロモーター活性測定用プラスミドを1mg/穴ずつ、細胞内に導入する。

導入後、1時間で試験化合物を0.1ml/穴ずつ添加し、37℃、5% CO₂ 孵卵器で48時間培養する。

培養後、ピッカジーンLT(東洋インキ社製)を0.1ml/穴ずつ加え5分攪拌後、96穴プレート測定装置(アマシャム-ファルマシア社製)で発光活性を測定する。

(3) 上記(1)のスクリーニング方法または(2)のスクリーニング用キットを用いて得られるUCP-2プロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

上記(1)のスクリーニング方法または(2)のスクリーニング用キットを用いて得られるUCP-2のプロモーター活性を上昇・促進する化合物が見いだせ

れば、該化合物は肥満症候群などの予防・治療剤となる。ひいてはいわゆる生活習慣病（糖尿病、高血圧、高脂血症など）などの根治治療剤としても用いられる。即ち、抗肥満薬、抗糖尿病薬、降圧薬、抗高脂血症薬などとして用いることができる。

また、該化合物がプロモーター活性を低下・阻害させるものであれば、解熱剤などとして用いることができる。

【0012】

該化合物を上記の疾患の予防および／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エ

タノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン性界面活性剤(例、ポリソルベート80(TM)、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

【0013】

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人(60kgとして)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0014】

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commision on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

【0015】

DNA : デオキシリボ核酸
 cDNA : 相補的デオキシリボ核酸
 A : アデニン
 T : チミン
 G : グアニン
 C : シトシン

【0016】

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

実施例1でクローニングしたヒトUCP-2のプロモーター領域を含むcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：2〕

ヒトUCP-2のプロモーター領域を含むcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：3〕

ヒトUCP-2のプロモーター領域を含むcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：4〕

ヒトUCP-2のプロモーター領域を含むcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：5〕

ヒトUCP-2のプロモーター領域を含むcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

【0017】

【実施例】

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

後述の実施例1で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli

)TOP10/pCR-ucp2p5' #1-10は、平成10年11月24日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (N I B H) に寄託番号 F E R M B P-6587として、平成10年11月11日から財団法人・発酵研究所 (I F O) に寄託番号 I F O 16219として寄託されている。

以下に実施例として本発明を詳細に記載するが、本発明はこれらの内容に限定されるものではない。

【0018】

実施例1 ヒトUCP-2cDNAのクローニング

ヒト腎臓cDNA 0.5ng(Clontech Laboratory California USA)を鋳型とし、先に報告されているヒトUCP-2 cDNA(Gimeno, R.ら (1997) Diabetes vol. 46, 900-906)の塩基番号55から82までの5'-ATGGTTGGGTTCAAGGCCACAGATGTGCCC-3' および塩基配列番号1300から1329に相補的な塩基配列5'-ATACAGGCCGATGCGGACAGAG GCAAAGCT-3' のオリゴヌクレオチドプライマーを用いPCR法(94℃ 5min.加熱後、94℃ 1min.、55℃ 0.5min.、72℃ 1.5min.を30cycles、その後、72℃ 5min.加温)によりヒトUCP-2遺伝子を増幅後、PCR-bluntベクターに結合した。この結合したプラスミドDNAを鋳型として、オリゴヌクレオチドプライマーを作製し PCR DIG Probe Synthesis Kit (ベーリンガー・マンハイム株式会社)を用い添付の手順書に従いでプローブの調製を行った。調製したプローブを用い、ヒトゲノミックDNAライブラリー(Clontech Laboratory, California USA) 3×10^6 個のファージをブラークハイブリダイゼーション法によりニトロセルロースフィルターを用いてスクリーニングした。ブラークハイブリダイゼーションは、DIG Easy hyb(ベーリンガー・マンハイム株式会社)、DIG Wash and Block Buffer Set(ベーリンガー・マンハイム株式会社)およびDIG Nucleic acid Detection Kit (ベーリンガー・マンハイム株式会社)を用い添付の手順書に従い行った。その結果、 3×10^6 個ファージより8種の陽性クローンを得ることか出来た。各クローンのうち、先に報告されているヒトUCP-2 cDNA(Gimeno, R.E.ら (1998) Diabetes 47 (4), 685-687)配列から得られるnon-coding Exonの内部のプライマー(5'-CAAAGCTGCCAGTG GCTATCATGGCCCG-3')を合成し、non-coding Exonを含むものを EMBL3の配列を含むプライマー(5'-GACCGGTCGACCCAGATCTGGGTCGACCTG-3')とのPCRで検出し、UCP2の

5' 上流域を含むゲノミッククローンを得た。ゲノミッククローンからUCP2プロモーター領域を含む3.5Kbpの断片を調製し、pCR-bluntベクター(インビトロジェン社)に挿入し、形質転換体E. coli TOP10/pCR-UCP2P5' #1-10を作製した。その後、制限酵素地図を作製し塩基配列の決定を行った。決定した塩基配列を図1～図6に示す。図1～図6に示すように塩基配列番号2271～2326および、塩基配列番号3416～3505がヒトUCP-2cDNA(Gimeno, R.E.ら (1998))に、完全に一致した。さらにこれら一致した部分の塩基配列末端は、イントロン-エクソンの境界塩基配列の特徴であるシャーンボーンルールと合致したことから、一致した塩基配列間はイントロンであると考えられる。また、第1Exonの上流にはTATA-box配列の存在しないプロモーターの特長であるCpG島と思われる配列(塩基配列番号2070～2270付近)を確認した。そして、上述のプロモーター配列中には脂肪細胞関連遺伝子プロモーターのレギュレーター配列であるPPRE(塩基配列番号284～296)および、3カ所のC/EBP結合部位(塩基配列番号1316～1320、1364～1368、1698～1692)を確認した。

【 0 0 1 9 】

実施例 2 ヒトUCP-2遺伝子のプロモーター活性の検定

クローニングしたゲノムDNA断片がプロモーター活性をもつことを確認するためにルシフェラーゼアッセイ法を行った。ホタルルシフェラーゼをリポーター遺伝子とするプラスミド、pGL3-Basic plasmid (プロメガ株式会社製) をベクターとした。内部標準として、SV40プロモーター支配下にシーパンジールシフェラーゼを発現するpRL-SV40 plasmid (プロメガ株式会社製) を用いた。

ヒトUCP-2遺伝子ゲノムDNAからEcoRI断片(3.5kb)を単離し、Blunting High Kit(東洋紡社製)を用いて平滑化後、pGL3-Basic plasmid DNAをSmaIで消化したベクターに結合した。以上の手順でpGL3-Basicベクターに図1～図6中の塩基配列番号1～3505までの塩基が連結されたヒトUCP-2プロモーター/ルシフェラーゼベクターを作製した。作製したヒトUCP-2プロモーター/ルシフェラーゼベクターをUCP2を恒常的に発現していることをRT-PCRで確認したヒト肝臓癌細胞株HepG2へ一過的に導入する事により活性の検定を行った。

HepG2細胞を60000細胞/穴の濃度で24穴マルチプレート(ヌンク社製)に播種し

、37℃、5%CO₂で一晩培養した。一穴あたり1μgのヒトUCP-2プロモーター/ルシフェラーゼベクターDNAあるいは、pGL3-Basic DNAおよび0.1μgのpRL-SV40 DNAをSuperFect Transfection Reagent（キアゲン株式会社製）を用いて一過性導入を行った。その手順は、添付の手順書に従った。その後、24時間、37℃、5%CO₂で培養し、培養終了後、各ルシフェラーゼ活性をピッカジーンデュアルシーパンジー（ニッポンジー株式会社製）を用い添付の手順書に従い、検出した。測定データは、pRL-SV40由来のシーパンジールシフェラーゼ活性の値を内部標準として用いて、相対的な活性として測定した。その結果を、図7に示す。ヒトUCP-2プロモーター/ルシフェラーゼベクター由来のルシフェラーゼ活性は、プロモーターを含まないpGL3-Basicに比して非常に強い活性を示した。以上のことから、本発明のヒトUCP-2遺伝子ゲノムDNAは、生体内でのUCP-2遺伝子発現様式を反映したプロモーター活性を有していることがわかった。

【0020】

【配列表】

【配列番号：1】

配列の長さ：3505

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

```

AACGGATCTG CCCGCCTCAG CCTCCCAAAG TGCTGGGATT GCAGGCGTGA GCCACCTCAC    60
CTGGCTACAA GTTTTCAAAA TACATTTATC TAGTACCCAT ACATTCTCCA GTTTGTCCAC    120
AGGACATCTT ATGACTTGAG CAAGCTGCTA AAAATCCAAG GGTGCAGCGT TTGTATGTCT    180
ATAGGATTGC TCAGATCTGC CCCCACCCTG AAAGAATTTA AGAGAATTTC TTGAGGCCAG    240
GCACAGTGGC TCACACCTGT AATTCCAGTA CTGTGAGAGT CCGAGGTCAG AGGACTGCTT    300
GAGGCCAGGA GTTCAAGAGC AGCCTGGACA ACACAGGGAG ACCTGTCACT ACAAAGAATA    360
AATAAATTAG CCAGGCTTAG TGGCTCATCC CTGTGGTCCC AGCTACTAGG GAGGCAGAAG    420
TAGGACTGCT TGTCCCAGGA GGTCAAGACT GCAGTGAGCT GAGACCCAGC CACCTGCATT    480

```

CCAGCCTGGG CAACAAAAAG AGACCCTGTC TCAAAAAATA AGTTAAATAA ATAAATAATA 540
 AAAATAGTTT AAACCCTAAA CACATCTTCT TTTTCAAAGA GGA CTCTTA AGGACTTCAT 600
 GCTGCGTCCT GTTGATCTCC ACTTCCCTTT TTCAGCGTCC AACTTTTAA CAGTCTCTTT 660
 TGCCAAGGAT AATAAGTATA TAGTTTCTGG AATCCAGATT CTTCCCTGTT TGGACAGCCA 720
 GGGGGACAAT TTTTGGTCTG CAGGCCTTTG CATCTGTTCT GCTGTTGCTC AGCAATCTCA 780
 CAGCAAATTT GCCGAGCCTC TCCGGAATGC ACAGCCAGAC AGAGCTCAGC GCAAAAGCTA 840
 GAGAACCTGG CGGAGGGAGA CTCACAGTGC CACAAAAAAA CTTTATCTTT TCTTTTTTTT 900
 TTTCTTTTCT TTCTTTCTCT TTCTTTCTTG TCTTTCTGTC TTTCTCTCT CTCTCTCTGT 960
 CTTTCTTTCC TCTCTTTCTT TCTTTTTTCC TACATGGCAA GATCTCCTCA TGGCAGAAAT 1020
 AATCTGCCTT GACTTCTGTT TCCACGCTGC TTCTGCCAGG ACCATGCGCT CGGCGTGTTT 1080
 TTCTTTCCGC TATAATTATC CAGGCCCATC CCAGCTCTGG TCCCCTCAGC TGTTCCCTGG 1140

 CAGTCCGTTG TGCTGGTGAA AACACATATG GCGCCGGCCT GACCAGGGTG TAAGTGTGTG 1200

 AATATCAGGA AGATGACTGA ACGTCTTTGG GACTCCGTTT CCTCATTGTA AAATGGAGGT 1260
 TAATACCAGC CTTCTTCTAC TCCCCAAACG CACGTGTTTG TCCCGGCCAG AGGGCCCAAT 1320
 TGTTGGCTGT TCACGCATCA GTTACCCCCA CAGGACGGGT CAGCCAATTA AAGGCGAACC 1380
 AGGCCCCGGT CATCTCCTGA CGCCTTTTCT CATCCCAGGG CTGGACAGGC AGCTGGCCTG 1440
 GGCCCCGGCTC TGCCTTGTC ACGTGGGGGG CCGGCCCGTT TGCTTGTCTG TGTGTAGGAG 1500
 CGTGAGGTCA CGCTGGGTGC TCCCGCCCCG CCGGGGCCCT TAGTGTCCTT GGTCCCTAAA 1560
 CGCCAGGCCG CTCCACCGGG GGAGAAGGCG CGAACCCAG CCGAGCCCAA CGGCTGTTGT 1620
 CGGTTGCCGG GCCACCTGTT GCTGCAGTTC TGATTGGTTC CTTCCCCCGA CAACGCGGCG 1680
 GCTGTAACCA ATCGACAGCG AGGCCGGTCG CGAGGCCCCA GTCCCGCCCT GCAGGAGCCA 1740
 GCCGCGCGCT CGCTCGCAGG AGGGTGGGTA GTTGCCCCAG CGTAGGGGGG CTGGGCCCCAT 1800
 AAAAGAGGAA GTGCACTTAA GACACGGCCC CGCTGGACGC TTGTTAGAAA CCGTCCTGGC 1860
 TGGGAAGGCA AGAGGTGTGT GACTGGACAA GACTTGTTTC TGGCGGTCAG TCTTGCCATC 1920
 CTCACAGAGG TTGGCGGCCC GAGAGAGTGT GAGGCAGAGG CGGGGAGTGG CAAGGGAGTG 1980
 ACCATCTCGG GGAACGAAGG AGTAAACGCG GTGATGGGAC GCACGGAAAC GGGAGTGGAG 2040
 AAAGTCATGG AGAGAACCCT AGGCGGGGCG GTCCCCGCGG AAAGGCGGCT GCTCCAGGGT 2100
 CTCCGCACCC AAGTAGGAGC TGGCAGGCCG GGCCCCGCCC CGCAGGCCCC ACCCGGGGCC 2160
 CCGCCCCCGA GGCTTAAGCC GCGCCGCCGC CTGCGCGGAG CCCCCTGCG AAGCCCAGCT 2220

GCGCGCGCCT TGGGATTGAC TGTCCACGCT CGCCCGGCTC GTCCGACGCG CCCTCCGCCA 2280
 GCCGACAGAC ACAGCCGCAC GCACTGCCGT GTTCTCCCTG CGGCTCGGTG AGCCTGGCCC 2340
 CAGCCCTGCG CCCTTTGCGC CCCCCACGCT TGTTCTGCGT GCGCTGCCCG CTCTTCCATT 2400
 TACCTTCTCT CCCACCCAAG TTTGTACTCT TTTCTTTCTC TCGGTTTTAT TTTTGTGTTT 2460
 TGTTTGTGTTG TTTGAGACAG GCTTTCGCTC TGTCTCCAG GCTGGAGTGC AGTGGCGCGA 2520
 TCTCGGCTCA CTGCAGCCTC CACCTCCCAG GTTCAAGCGA TCCGCCTGCC GAGTAGCTGG 2580
 GATTACAGGC GCCCGCCACC ACGCCTGGCT AATTTTTGTG TTTTGTAGAG ATGGGGTTTC 2640
 GCCATGTTGG CCAGGCTGGC CTCGAACTGC TCAGCTCAAG CAATCCGCCC GCCTCGGCCT 2700
 CACAAAGTCC TAGAATTTTA GGCATGAGCC TCCGGGTCCG GCCTGTGCTA ATCCTTTCTG 2760
 TCCTTGTTTC TTTATTTCCC TTCTCTCTTT TTCTTAGTCC CTTTGTGTTCT TTCCCTCTCC 2820
 CGTTCAGTTG GCTGTCGTTT GAGCCTCCAC CTTTCACTC CCTCCTTTCC ACCACGATGC 2880

 CGAGGGCTGC GTTGGATGGG GACCATCAGC GATGACCACA ATGACCTCTC CCTTACCAGG 2920
 CAGCTCCAGG CAGTGTTCTT GCACCGCCTT TCCCAAGGCT TGGGGGCTTT TTCTAGTGGG 3000
 CTTTGAGCTG CTCAATCTGG CCTCTGCAGG GCCGGCTCCC AGCCCTTCCA ACCTCCTCAC 3060
 AGCCCGACCT GGGACCTAGC CAATTCCCGG AGAGTCTCTG TCCCATCGTG ACCCCCTCAC 3120
 AACTCTCCCA CTCACCAAAG TCTGATGACT GTGCTAGGGG GTGCTTATAT AGAGTACTGA 3180
 GTGTTACAAA AGCAGAAGTC TGGATGAGAA CCAATTTGTG ATATTAAGCA GGTGGGGTGG 3240
 GGGTGGGGAG TGTACCTAGG TTCATTTTCC GCCCTGCTTT TCCCCTTTCC AGTGTGTGCA 3300
 CTTAACCAGT CCCTGGGCCC TGTTCCCCAT CCCCCTCCAA GGCATGGATT GGGTGGGCTT 3360
 GTGTGTCTTG GGGCAGGTGG CCCTTTCTAA ACTCTCTGCC TTTGCTCACC CACAGGACAC 3420
 ATAGTATGAC CATTAGGTGT TTCGTCTCCC ACCCATTTTC TATGGA AAAAC CAAGGGGATC 3480
 GGGCCATGAT AGCCACTGGC AGCTT 3505

【0021】

【配列番号：2】

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATGGTTGGGT TCAAGGCCAC AGATGTGCCC

30

【0022】

【配列番号：3】

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATACAGGCCG ATGCGGACAG AGGCAAAGCT

30

【0023】

【配列番号：4】

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CAAAGCTGCC AGTGGCTATC ATGGCCCCG

28

【0024】

【配列番号：5】

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GACCGGTCGA CCCAGATCTG GGTCGACCTG

30

【0025】

【発明の効果】

本発明のUCP-2プロモーターは、レギュレーター配列を含むので、通常それらを含まないものに比べ、よりヒト生体内に近いUCP-2の発現様式を反映した活性を有する。よって、よりヒト生体内に近い条件でヒトの疾患の治療、薬剤のスクリーニング系の設定などにおいて用いるベクターに組込むプロモーターとして使用できる。

【0026】

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例1でクローニングしたヒトUCP-2のプロモーター領域を含むcDNAの塩基配列を示す（図2に続く）。

【図2】 実施例1でクローニングしたヒトUCP-2のプロモーター領域を含むcDNAの塩基配列を示す（図1の続き、図2に続く）。

【図3】 実施例1でクローニングしたヒトUCP-2のプロモーター領域を含むcDNAの塩基配列を示す（図2の続き、図4に続く）。

【図4】 実施例1でクローニングしたヒトUCP-2のプロモーター領域を含むcDNAの塩基配列を示す（図3の続き、図5に続く）。

【図5】 実施例1でクローニングしたヒトUCP-2のプロモーター領域を含むcDNAの塩基配列を示す（図4の続き、図6に続く）。

【図6】 実施例1でクローニングしたヒトUCP-2のプロモーター領域を含むcDNAの塩基配列を示す（図5の続き）。

【図7】 実施例2で行われたルシフェラーゼ活性を示す図を示す。

【書類名】 図面

【図 1】

| | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| AACGGATCTG CCCGCCTCAG CCTCCCAAAG TGCTGGGATT GCAGGCCTGA GCCACCTCAC | | | | | |
| 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| CTGGCTACAA GTTTTCAAAA TACATTTATC TAGTACCCAT ACATTCTCCA GTTTGTCCAC | | | | | |
| 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| AGGACATCTT ATGACTTGAG CAAGCTGCTA AAAATCCAAG GGTGCAGCGT TTGTATGTCT | | | | | |
| 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| ATAGGATTGC TCAGATCTGC CCCCACCCTG AAAGAATTTA AGAGAATTTC TTGAGGCCAG | | | | | |
| 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| GCACAGTGGC TCACACCTGT AATTCCAGTA CTGTGAGAGT CCGAGGTCAG AGGACTGCTT | | | | | |
| PPRE | | | | | |
| 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| GAGGCCAGGA GTTCAAGAGC AGCCTGGACA ACACAGGGAG ACCTGTCACT ACAAAGAATA | | | | | |
| 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
| AATAAATTAG CCAGGCTTAG TGGCTCATCC CTGTGGTCCC AGCTACTAGG GAGGCAGAAG | | | | | |
| 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
| TAGGACTGCT TGTCCCAGGA GGTCAAGACT GCAGTGAGCT GAGACCCAGC CACCTGCATT | | | | | |
| 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 |
| CCAGCCTGGG CAACAAAAAG AGACCCTGTC TCAAAAAATA AGTTAAATAA ATAAATAATA | | | | | |
| 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 |
| AAAATAGTTT AAACCCTAAA CACATCTTCT TTTTCAAAGA GGAATTCTTA AGGACTTCAT | | | | | |
| 610 | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 |
| GCTGCGTCCT GTTGATCTCC ACTTCCCTTT TTCAGCGTCC ACACTTTTAA CAGTCTCTTT | | | | | |

【図 2】

| | | | | | |
|-------------------|------------|------------|-------------------|-------------|------------|
| 670 | 680 | 690 | 700 | 710 | 720 |
| TGCCAAGGAT | AATAAGTATA | TAGTTTCTGG | AATCCAGATT | CTTCCCTGTT | TGGACAGCCA |
| 730 | 740 | 750 | 760 | 770 | 780 |
| GGGGGACAAT | TTTTGGTCTG | CAGGCCTTTG | <u>CATCTGTTCT</u> | GCTGTTGCTC | AGCAATCTCA |
| GRE | | | | | |
| 790 | 800 | 810 | 820 | 830 | 840 |
| CAGCAAATTT | GCCGAGCCTC | TCCGGAATGC | ACAGCCAGAC | AGAGCTCAGC | GCAAAAGCTA |
| 850 | 860 | 870 | 880 | 890 | 900 |
| GAGAACCTGG | CGGAGGGAGA | CTCACAGTGC | CACAAAAAAA | CTTTATCTTT | TCTTTTTTTT |
| 910 | 920 | 930 | 940 | 950 | 960 |
| TTTCTTTTCT | TTCTTTCTCT | TTCTTTCTTG | TCTTTCTGTC | TTTCCCTCTCT | CTCTCTCTGT |
| <hr/> | | | | | |
| 970 | 980 | 990 | 1000 | 1010 | 1020 |
| CTTTCTTTCC | TCTCTTTCTT | TCTTTTTTCC | TACATGGCAA | GATCTCCTCA | TGGCAGAAAT |
| 1030 | 1040 | 1050 | 1060 | 1070 | 1080 |
| <u>AATCTGCCTT</u> | GACTTCTGTT | TCCACGCTGC | TTCTGCCAGG | ACCATGCGCT | CGGCGTGTTT |
| GRE | | | | | |
| 1090 | 1100 | 1110 | 1120 | 1130 | 1140 |
| TTCTTTCCGC | TATAATTATC | CAGGCCCATC | CCAGCTCTGG | TCCCCTCAGC | TGTTCCCTGG |
| 1150 | 1160 | 1170 | 1180 | 1190 | 1200 |
| CAGTCCCTTC | TGCTGGTGAA | AACACATATG | GCGCCGGCCT | GACCAGGGTG | TAAGTGTGTG |
| 1210 | 1220 | 1230 | 1240 | 1250 | 1260 |
| AATATCAGGA | AGATGACTGA | ACGTCTTTGG | GACTCCGTTT | CCTCATTGTA | AAATGGAGGT |

【図 3】

| | | | | | |
|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| 1270 | 1280 | 1290 | 1300 | 1310 | 1320 |
| TAATACCAGC | CTTCTTCTAC | TCCCCAAACG | CACGTGTTTG | TCCCGGCCAG | AGGGCCCAAT |
| | | | | | C/EBP |
| 1330 | 1340 | 1350 | 1360 | 1370 | 1380 |
| TGTTGGCTGT | TCACGCATCA | GTTACCCCCA | CAGGACGGGT | CAGCCAATTA | AAGGCGAACC |
| | | | | C/EBP | |
| 1390 | 1400 | 1410 | 1420 | 1430 | 1440 |
| AGGCCCCGGTC | CATCTCCTGA | CGCCTTTTCT | CATCCCAGGG | CTGGACAGGC | AGCTGGCCTG |
| | | | | MyoD | |
| 1450 | 1460 | 1470 | 1480 | 1490 | 1500 |
| GGCCCCGGCTC | TGCCTTGTC | CGTGCGGGGG | CCGGCCCCGTT | TGCTTGCTCG | TGTGTAGGAG |
| | GRE | | | | |
| 1510 | 1520 | 1530 | 1540 | 1550 | 1560 |
| CGTGAGGTCA | CGCTGGGTGC | TCCCGCCCCG | CCGGGGCCTT | TAGTGTCCCT | GGTCCCTAAA |
| 1570 | 1580 | 1590 | 1600 | 1610 | 1620 |
| CGCCAGGCCG | CTCCACCGGG | GGAGAAGGCG | CGAACCCCAG | CCGAGCCCAA | CGGCTGTTGT |
| 1630 | 1640 | 1650 | 1660 | 1670 | 1680 |
| CGGTTGCCCG | GCCACCTGTT | GCTGCAGTTC | TGATTGGTTC | CTTCCCCCGA | CAACGCGGCG |
| 1690 | 1700 | 1710 | 1720 | 1730 | 1740 |
| GCTGTAACCA | ATCGACAGCG | AGGCCGGTCG | CGAGGCCCCA | GTCCCGCCCT | GCAGGAGCCA |
| | C/EBP | | | | |
| 1750 | 1760 | 1770 | 1780 | 1790 | 1800 |
| GCCGCGCGCT | CGCTCGCAGG | AGGGTGGGTA | GTTTGCCCAG | CGTAGGGGGG | CTGGGCCCAT |
| 1810 | 1820 | 1830 | 1840 | 1850 | 1860 |
| AAAAGAGGAA | GTGCACTTAA | GACACGGCCC | CGCTGGACGC | TTGTTAGAAA | CCGTCCTGGC |
| 1870 | 1880 | 1890 | 1900 | 1910 | 1920 |
| TGGGAAGGCA | AGAGGTGTGT | GACTGGACAA | GACTTGTTTC | TGGCGGTCAG | TCTTGCCATC |

【図 4】

| | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1930 | 1940 | 1950 | 1960 | 1970 | 1980 |
| CTCACAGAGG | TTGGCGGCCC | GAGAGAGTGT | GAGGCAGAGG | CGGGGAGTGG | CAAGGGAGTG |
| 1990 | 2000 | 2010 | 2020 | 2030 | 2040 |
| ACCATCTCGG | GGAACGAAGG | AGTAAACGCG | GTGATGGGAC | GCACGGAAAC | GGGAGTGGAG |
| 2050 | 2060 | 2070 | 2080 | 2090 | 2100 |
| AAAGTCATGG | AGAGAACCCT | AGGCGGGGCG | GTCCCCGCGG | AAAGGCGGCT | GCTCCAGGGT |
| 2110 | 2120 | 2130 | 2140 | 2150 | 2160 |
| CTCCGCACCC | AAGTAGGAGC | TGGCAGGCCC | GGCCCCGCCC | CGCAGGCCCC | ACCCCGGGCC |
| 2170 | 2180 | 2190 | 2200 | 2210 | 2220 |
| CCGCCCCCGA | GGCTTAAGCC | GCGCCGCCGC | CTGCGCGGAG | CCCCACTGCG | AAGCCCAGCT |
| 2230 | 2240 | 2250 | 2260 | 2270 | 2280 |
| GCGCGCGCCT | TGGGATTGAC | TGTCCACGCT | CGCCCGGCTC | GTCCGACGCG | CCCTCCGCCA |
| 2290 | 2300 | 2310 | 2320 | 2330 | 2340 |
| GCCGACAGAC | ACAGCCGCAC | GCACTGCCGT | GTTCTCCCTG | CGGCTCGGTG | AGCCTGGCCC |
| 2350 | 2360 | 2370 | 2380 | 2390 | 2400 |
| CAGCCCTGCG | CCCTTTGCGC | CCCCCAGCT | TGTTCTGCGT | GCGCTGCCCC | CTCTTCCATT |
| 2410 | 2420 | 2430 | 2440 | 2450 | 2460 |
| TACCTTCTCT | CCCACCCAAG | TTTGTACTCT | TTTCTTTCTC | TCGGTTTTAT | TTTTTGTTTT |
| 2470 | 2480 | 2490 | 2500 | 2510 | 2520 |
| TGTTTGTTTG | TTTGAGACAG | GCTTTCGCTC | TGTCTCCCAG | GCTGGAGTGC | ACTGGCGCGA |
| 2530 | 2540 | 2550 | 2560 | 2570 | 2580 |
| TCTCGGCTCA | CTGCAGCCTC | CACCTCCCAG | GTTCAAGCGA | TCCGCCTGCC | GAGTAGCTGG |

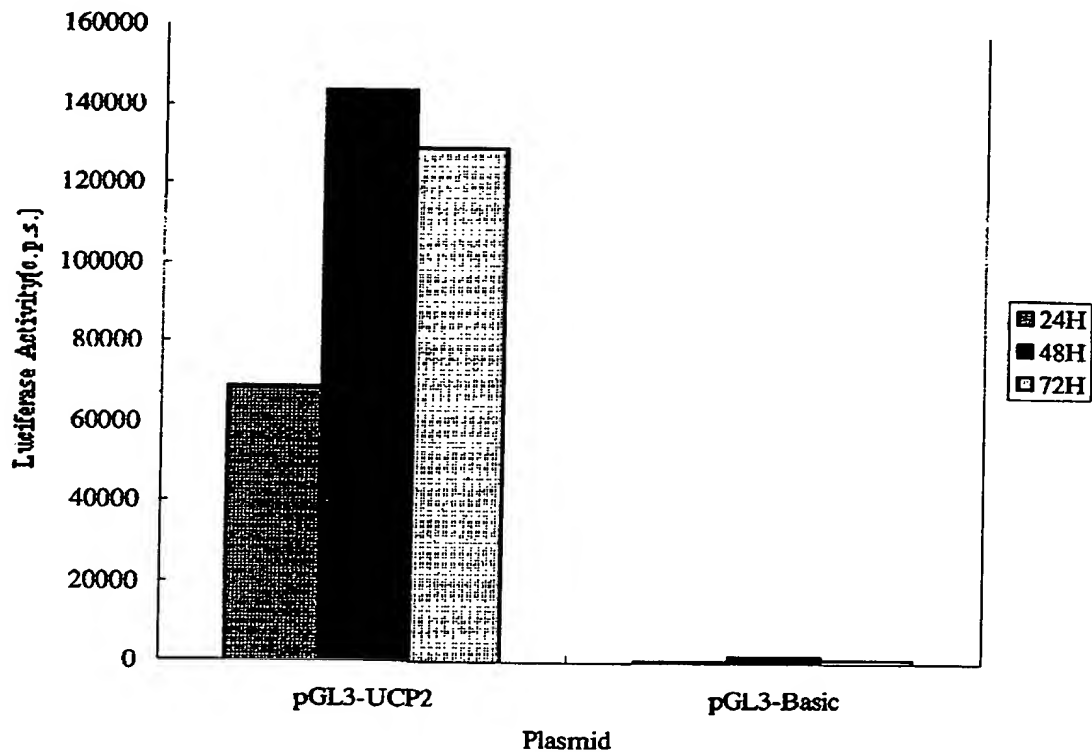
【図5】

| | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 2590 | 2600 | 2610 | 2620 | 2630 | 2640 |
| GATTACAGGC | CCCCGCCACC | ACGCCTGGCT | AATTTTGTG | TTTGTTAGAG | ATGGGGTTTC |
| 2650 | 2660 | 2670 | 2680 | 2690 | 2700 |
| GCCATGTTGG | CCAGGCTGGC | CTCGAACTGC | TCAGCTCAAG | CAATCCGCCC | GCCTCGGCCT |
| 2710 | 2720 | 2730 | 2740 | 2750 | 2760 |
| CACAAAGTCC | TAGAATTTTA | GGCATGAGCC | TCCGGGTCCG | GCCTGTGCTA | ATCCTTTCTG |
| 2770 | 2780 | 2790 | 2800 | 2810 | 2820 |
| TCCTTGGTTC | TTTATTTCCC | TTCTCTCTTT | TTCTTAGTCC | CTTTTGTTC | TTCCCTCTCC |
| 2830 | 2840 | 2850 | 2860 | 2870 | 2880 |
| CGTTCAGTTG | GCTGTCGTTT | GAGCCTCCAC | CTTTTCACTC | CCTCCTTTCC | ACCACGATGC |
| 2890 | 2900 | 2910 | 2920 | 2930 | 2940 |
| CGAGCCCTGC | CTTGATGGG | GACCATCAGC | GATGACCACA | ATGACCTCTC | CCTTACCAGG |
| 2950 | 2960 | 2970 | 2980 | 2990 | 3000 |
| CAGCTCCAGG | CAGTGTTCCT | GCACCGCCTT | TCCCAAGGCT | TGGGGGCTTT | TTCTAGTGGG |
| 3010 | 3020 | 3030 | 3040 | 3050 | 3060 |
| CTTTGAGCTG | CTCAATCTGG | CCTCTGCAGG | GCCGGCTCCC | AGCCCTTCCA | ACCTCCTCAC |
| 3070 | 3080 | 3090 | 3100 | 3110 | 3120 |
| AGCCCGACCT | GGGACCTAGC | CAATTCCCGG | AGAGTCTCTG | TCCCATCGTG | ACCCCTCAC |
| 3130 | 3140 | 3150 | 3160 | 3170 | 3180 |
| AACTCTCCCA | CTCACCAAAG | TCTGATGACT | GTGCTAGGGG | GTGCTTATAT | AGAGTACTGA |
| 3190 | 3200 | 3210 | 3220 | 3230 | 3240 |
| GTGTTACAAA | AGCAGAAGTC | TGGATGAGAA | CCAATTTGTG | ATATTAAGCA | GGTGGGGTGG |

【図 6】

| | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 3250 | 3260 | 3270 | 3280 | 3290 | 3300 |
| GGGTGGGGCAG | TGTACCTAGG | TTCATTTTCC | GCCCTGCTTT | TCCCCTTTCC | AGTGTGTGCA |
| 3310 | 3320 | 3330 | 3340 | 3350 | 3360 |
| CTTAACCAGT | CCCTGGGCCC | TGTTCCCCAT | CCCCCTCCAA | GGCATGGATT | GGGTGGGCTT |
| 3370 | 3380 | 3390 | 3400 | 3410 | 3420 |
| GTGTGTCTTG | GGGCAGGTGG | CCCTTTCTAA | ACTCTCTGCC | TTTGCTCACC | CACAGGACAC |
| 3430 | 3440 | 3450 | 3460 | 3470 | 3480 |
| ATAGTATGAC | CATTAGGTGT | TTCGTCTCCC | ACCCATTTTC | TATGGAAAAC | CAAGGGGATC |
| 3490 | 3500 | 3510 | 3520 | 3530 | 3540 |
| GGGCCATGAT | AGCCTTGGC | AGCTT..... | | | |

【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 UCP-2のレギュレーター配列を含むプロモーター領域を含有するDNAの提供。

【解決手段】 アンカッピングプロテイン-2(UCP-2)のレギュレーター配列を含むプロモーター領域を含有するDNA、該DNAで形質転換された形質転換体、該形質転換体を用いることを特徴とするUCP-2プロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、該形質転換体を用いることを特徴とする抗肥満薬、抗糖尿病薬、降圧薬、抗高脂血症薬または解熱薬のスクリーニング方法、該形質転換体を用いることを特徴とするUCP-2プロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、該スクリーニング方法または該スクリーニング用キットを用いて得られるUCP-2プロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬組成物など。

【効果】 本発明のUCP-2プロモーターは、レギュレーター配列を含むので、通常それらを含まないものに比べ、よりヒト生体内に近いUCP-2の発現様式を反映した活性を有する。よって、よりヒト生体内に近い条件でヒトの疾患の治療、薬剤のスクリーニング系の設定などにおいて用いるベクターに組込むプロモーターとして使用できる。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002934]

1. 変更年月日 1992年 1月22日

[変更理由] 住所変更

住 所 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
氏 名 武田薬品工業株式会社

THIS PAGE BLANK (USPFI)

THIS PAGE BLANK (USPFI)